

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-196280
 (43)Date of publication of application : 06.08.1996

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C12N 1/21
 C12P 13/06
 // C12N 9/24
 (C12N 1/21
 C12R 1:15)

(21)Application number : 07-012361
 (22)Date of filing : 30.01.1995

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC
 (72)Inventor : SUGIMOTO MASAKAZU
 OTONA KIYOKO
 NAGASE KAZUO
 TSUCHIYA MAKOTO
 MATSUI YUTAKA
 YOSHIHARA YASUHIKO
 NAKAMATSU WATARU

(54) SUCROSE GENE ORIGINATED FROM CORYNEFORM BACTERIUM AND ITS UTILIZATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject gene capable of increasing the sucrose-utilizing ability of a Coryneform bacterium and useful for obtaining an L-amino acid or nucleic acid in a good yield in a short time from raw materials containing the sucrose.

CONSTITUTION: This gene is originated from a Coryneform bacterium and codes a protein which has the amino acid sequence of the formula and which has a sucrase activity. The gene is obtained by a method described in Japanese unexamined patent HEI 5-244958, comprising producing a gene library from the chromosome DNA of the Coryneform bacterium, subjecting the gene library to a colony hybridization with a probe synthesized under the homology in the base sequence of the sucrase gene, selecting a sucrase activity-expressing colony as a sucrase gene-introducing strain from hybridized colonies, and subsequently obtaining a DNA fragment containing the sucrase gene from the cell of the strain.

Val Ala Thr Glu Lys Ser Ser Leu Arg
 Phe Ala Thr Phe Val Thr Phe
 1 19
 Phe Glu Gly Arg Lys Ala Arg Phe Ala
 Gly Met Trp Val Arg Gly Arg 28
 39
 39
 1
 Gly Asp Arg Arg Val Ala Ser Val Lys
 Phe Gly Glu Lys Val Leu Ala
 385 386 387 388 389 390 391 392
 Arg Asp Arg Thr Ala Leu Gly Thr Thr
 Ala Gly Arg Gly Glu Val Ser
 403
 416
 Phe Ala Thr Ser Gly Lys Gly Arg
 422

LEGAL STATUS

17.09.2001

[Date of request for examination]
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
 [Date of final disposal for application]
 [Patent number]
 [Date of registration]
 [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-196280

(43) 公開日 平成8年(1996)8月6日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	8828-4B		
1/21				
C 1 2 P 13/06				
// C 1 2 N 9/24		9162-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-12361

(22) 出願日 平成7年(1995)1月30日

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 杉本 雅一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 乙名 聖子

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 長瀬 和男

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コリネホルム細菌由来のシュクラゼ遺伝子とその利用

(57) 【要約】

【構成】 コリネホルム細菌に由来し、シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターを連結して得られる組換えDNAを、L-アミノ酸又は核酸生産能を有するコリネホルム細菌に導入し、該細菌をシュクロースを含む液体培地に培養し、培養液中に生成蓄積したL-アミノ酸又は核酸を採取する。

【効果】 本発明の方法によれば、シュクロース系原料から短時間に効率的にL-アミノ酸又は核酸を製造することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネホルム細菌由来で、配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するシュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項2】 配列表配列番号1に記載の塩基配列の2338番目から3609番目に至る塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターが連結されて得られる組換えDNA。

【請求項4】 請求項3記載の組換えDNAを保有し、かつL-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌。

【請求項5】 請求項4記載のコリネホルム細菌をシュクロースを含む液体培地に培養し、培養液中にL-アミノ酸又は核酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-アミノ酸又は核酸の製造方法。

【請求項6】 L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-イソロイシン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-プロリンより成る群、核酸が5'-イノシン、5'-イノシン酸、5'-グアノシン、5'-グアノシル酸より成る群から選ばれる、請求項5記載のL-アミノ酸又は核酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、L-アミノ酸発酵や核酸発酵に用いられるコリネホルム細菌に由来するシュクラゼ遺伝子、該遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターが連結して得られる組換えDNA、該組換えDNAを保有するコリネホルム細菌、及び該細菌を培養することによるL-アミノ酸又は核酸の製造方法に関する。

【0002】

【従来技術】 遺伝子操作技術を用いたL-アミノ酸生産菌の育種については従来より多くの研究がなされており、報告例も多数ある (Biotechnology Letters, Vol. 2, pp. 525-530 (1980), Appl. Environ. Microbiol., Vol. 144, pp. 181-190 (1979), 日本農芸化学会昭和56年度大会講演要旨集, p. 8 (1981)など)。しかしながら、これらはいずれもL-アミノ酸生合成系の遺伝子を増強することによって目的とするL-アミノ酸の菌体あたりの生産性を高めるものであって、発酵原料である糖の資化性を高めることによって生産効率を高めるものではなかった。

【0003】 一方、遺伝子操作技術を用いてL-アミノ酸生産菌の糖の資化性を变化させた報告としては、エシェリヒア・コリにシュクロース資化能を与えた例がある (特開昭61-119185号及び特開平2-171178号公報参照)。すなわち、シュクロースを取り込み、それをグル

コース-6-リン酸とフラクトースに分解する活性をエシェリヒア・コリに与え、本来エシェリヒア・コリが資化できないシュクロースを炭素源としてできるようにしたものである。また、各種L-アミノ酸生産菌として有用なコリネホルム細菌については、特開平5-244958号において、シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含む11.6 Kbpの大きさのDNA断片を取得したことが記載されているが、コリネホルム細菌内での当該遺伝子の発現については確認されておらず、シュクロースを原料とするL-アミノ酸や核酸の生産における当該遺伝子の増幅の効果は明らかでなかった。

【0004】

【本発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、コリネホルム細菌のシュクロースを資化する能力を増強することによりシュクロースを含む原料から短時間に効率よくL-アミノ酸又は核酸を製造する方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、コリネホルム細菌由来のシュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子の構造を明らかにし、当該遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターとの組換えDNAを取得し、L-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌に該組換えDNAを導入したところ、当該細菌がシュクロースを含む原料から従来より短い時間で収率良くL-アミノ酸又は核酸を生産できることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0006】 即ち、本発明は、(1) コリネホルム細菌由来で、配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するシュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子、(2) 配列表配列番号1に記載の塩基配列の2338番目から3609番目に至る塩基配列を有する上記(1)記載の遺伝子、(3) 上記(1)又は(2)に記載の遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターが連結されて得られる組換えDNA、(4) 上記(3)記載の組換えDNAを保有し、かつL-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌、及び、(5) 上記(4)記載のコリネホルム細菌をシュクロースを含む液体培地に培養し、培養液中にL-アミノ酸又は核酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-アミノ酸又は核酸の製造方法、を提供するものである。

【0007】 本発明にいうコリネホルム細菌とは、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., p. 599 (1974)に記載されているように、好気性のグラム陽性桿菌であり、従来よりコリネバクテリウム属に分類されている細菌、従来プレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、及びコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレビ

バクテリウム属細菌やミクロバクテリウム属細菌を含むものであり、一般にL-グルタミン酸生産菌として知られている下記のような微生物である。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム
コリネバクテリウム・カルナエ
コリネバクテリウム・グルタミカム
コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
コリネバクテリウム・メラセコーラ
ブレバクテリウム・ディバリガタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
ブレバクテリウム・インマリオフィラム
ブレバクテリウム・ラクトファーマメントム (コリネバクテリウム・グルタミカム)
ブレバクテリウム・ロゼウム
ブレバクテリウム・サッカロリティカム
ブレバクテリウム・チオゲニタリス
ミクロバクテリウム・アンモニオフィラム

【0008】具体的に例示すると、下記のようなL-グルタミン酸生産性の野生株及びその変異株、並びにこれらから誘導されるL-アミノ酸又は核酸生産株が挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020
コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965
ブレバクテリウム・ディバリガタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14020
ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14067
ブレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068
ブレバクテリウム・ラクトフェルメントム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13869
ブレバクテリウム・ロゼウム ATCC13825
ブレバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066
ブレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240
ミクロバクテリウム・アンモニオフィラム ATCC15354

【0009】本発明においてシュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子とは、シュクロースを加水分解しグルコースとフラクトースを生成する活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を指す。シュクラゼ活性は菌体がシュクロースを炭素源として利用する時に重要である。シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を取得するには、特開平5-244958号公報記載の方法によ

り、まず、コリネホルム細菌の染色体DNAより遺伝子ライブラリーを作成し、次いで他の微生物について公知となっているシュクラゼ遺伝子の塩基配列における相同性をもとに合成したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズするコロニーのうちシュクラゼ活性を発現するものをシュクラゼ遺伝子導入株として選び出し、当該株の菌体からシュクラゼ遺伝子を含むDNA断片として取得すればよい。

【0010】本発明において、シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片を連結するベクターとしては、コリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なものであれば特に制限はないが、通常コリネホルム細菌由来のプラスミドを用いればよい。具体的には、pH M1519 (Agric. Biol. Chem., Vol. 48, pp. 2901-2903 (1984))、pAM330 (Agric. Biol. Chem., Vol. 48, pp. 2901-2903 (1984))、及びこれらをベースとした薬剤耐性プラスミド等である。また、相同組換えやインサクションシーケンスを用いて上記遺伝子を染色体中に導入することも可能である。相同組換えについては、温度感受性複製起点を用いたコリネホルム細菌の染色体遺伝子組換え法があり (特開平5-7491号公報参照)、また、コリネホルム細菌由来のインサクションシーケンスとしては、IS714、IS719、IS903等があり、これらを利用すればよい (W093/18151号公報参照)。

【0011】シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換えDNAを保有し、かつL-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌は、L-アミノ酸または核酸生産能を有する株を宿主菌とし、これに当該組換えDNAを導入することにより取得することができる。宿主菌として使用できるコリネホルム細菌の具体例としては、例えばL-グルタミン酸生産菌の野生株及びその変異株、並びにL-グルタミン酸生産菌より誘導される各種L-アミノ酸生産株又は核酸生産株が挙げられる。L-グルタミン酸以外のL-アミノ酸としては、L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-イソロイシン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-プロリン等コリネホルム細菌が生産可能なL-アミノ酸ならいずれでもよい。また、核酸としては5'-イノシン、5'-イノシン酸、5'-グアノシン、5'-グアニル酸等が挙げられる。

【0012】以下、各L-アミノ酸及び核酸の生産に好適な宿主の具体例を示す。

(1) L-グルタミン酸製造に好適な宿主

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020
コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965
 プレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14020
 プレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14067
 プレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068
 プレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13869
 プレバクテリウム・ロゼウム ATCC13825
 プレバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066
 プレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240
 ミクロバクテリウム・アンモニオフィラム ATCC15354
 上記の野生株に加えて、これらから誘導された下記のような変異株も宿主として使用できる。
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12475 (FERM BP-2922) (特開平3-49690号)
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12476 (FERM BP-2923) (特開平3-49690号)
 プレバクテリウム・フラバム AJ12477 (FERM BP-2924) (特開平3-49690号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12478 (FERM BP-2925) (特開平3-49690号)
 【0013】(2) L-リジン製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12031 (FERM BP-277) (特開昭60-62994号)
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ39134 (FERM BP-2923) (特開昭60-62994号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3463 (FERM P-1987) (特公昭51-34477号)
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11082 (NRRL B-11470, FERM P-3840) (特公昭59-4993号)
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム AJ11094 (NRRL B-11472, FERM P-3856) (特公昭59-4993号)
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12435 (FERM BP-2294) (特開平6-7182号)
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12592 (FERM BP-3239) (特開平6-7182号)
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12593 (FERM BP-3240) (特開平6-7182号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12596 (FERM BP-3242) (特開平6-7182号)
 【0014】(3) L-スレオニン製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11188 (FERM P-4190) (特開昭60-87788号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11682 (FERM BP-118) (特公平2-31956号)
 プレバクテリウム・フラバム AJ11683 (FERM BP-119) (特公平2-31956号)
 【0015】(4) L-アスパラギン酸製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・フラバム AJ3859 (FERM P-2799)

(特開昭51-61689号)
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3860 (FERM P-2800) (特開昭51-61689号)
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ3877 (FERM P-2803) (特開昭51-61689号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3876 (FERM P-2802) (特開昭51-61689号)
 【0016】(5) L-イソロイシン製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12404 (FERM P-10141) (特開平2-42988号)
 プレバクテリウム・フラバム AJ12405 (FERM P-10142) (特開平2-42988号)
 【0017】(6) L-アルギニン製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・フラバム AJ12144 (FERM P-7642) (特公平5-27388号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12145 (FERM P-7643) (特公平5-27388号)
 プレバクテリウム・フラバム ATCC21493 (特開平5-3793号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC21659 (特開平5-3793号)
 【0018】(7) L-プロリン製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11225 (FERM P-4390) (特開昭60-87788号)
 プレバクテリウム・フラバム AJ11512 (FERM P-5332) (特公昭62-36679号)
 プレバクテリウム・フラバム AJ11513 (FERM P-5333) (特公昭62-36679号)
 プレバクテリウム・フラバム AJ11514 (FERM P-5334) (特公昭62-36679号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11522 (FERM P-5342) (特公昭62-36679号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11523 (FERM P-5343) (特公昭62-36679号)
 【0019】(8) L-ヒスチジン製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・フラバム AJ3420 (FERM BP-2316) (特開平2-186994号)
 プレバクテリウム・フラバム AJ12425 (FERM BP-2212) (特開平2-186994号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12092 (FERM P-7273) (特開平2-186994号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12426 (FERM BP-2213) (特開平2-186994号)
 【0020】(9) L-バリン製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3434 (FERM P-1854) (特開昭63-258588号)
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12341 (FERM BP-1763) (特開昭63-258588号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3776 (FERM P-2601) (特開昭63-258588号)

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12342 (FERM BP-1764) (特開昭63-258588号)

【0021】(10) L-ロイシン製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3452 (FERM P-1965) (特開昭50-123877号)
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3719 (FERM P-2517) (特開昭50-123877号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3453 (FERM P-1966) (特開昭50-123877号)
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3455 (FERM P-1968) (特開昭50-123877号)

【0022】(11) L-フェニルアラニン製造に好適な宿主

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12637 (FERM BP-4160) (特開平5-49489号)
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ11761 (FERM P-6286) (特公平2-11235号)
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ12638 (FERM P-12382) (特公平2-11235号)

【0023】(12) L-グルタミンの製造に好適な宿主
 プレバクテリウム・フラバム AJ12418 (FERM BP-2205) (特開平2-186994号)

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ12419 (FERM BP-2206) (特開平2-186994号)

【0024】(13) 5'-イノシン酸の製造に好適な宿主

プレバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス) ATCC6872
 プレバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス) AJ12192 (FERM P-7949) (特公平5-998号)

コリネバクテリウム・エクイ AJ11347 (FERM P-4968) (特公平57-22558号)

コリネバクテリウム・エクイ AJ11350 (FERM P-4971) (特公平57-22558号)

コリネバクテリウム・エクイ AJ11352 (FERM P-4973) (特公平57-22558号)

【0025】(14) 5'-グアニル酸の製造に好適な宿主

コリネバクテリウム・エクイ ATCC21280

【0026】組換えDNAをコリネホルム細菌に導入する方法には特に制限はないが、通常よく用いられるプロトプラスト法 (Gene, Vol. 39, pp. 281-286 (1985))、電気パルス法 (特開平2-207791号) 等の方法を用いばよい。

【0027】かくして得られる組換えDNAを保有するコリネホルム細菌を培養する方法は、従来のL-アミノ酸生産菌又は核酸生産菌の培養方法と特に変わらない。すなわち、培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養

素を含有する通常のものが用いられる。炭素源としては、グルコース、シュクロース及びこれを含有する澱粉加水分解液、糖蜜等の糖類、酢酸等の有機酸類、エタノール等のアルコール類、又はこれらの混合物など、従来コリネホルム細菌の培養に用いられているものが使用できる。しかしながら、本発明の組換えDNAを保有するコリネホルム細菌は、シュクロースからL-アミノ酸又は核酸を生産する能力が顕著に向上しているため、炭素源としてシュクロースを含む培地で培養を行う際に本発明の効果が特に顕著となる。すなわち、ケーンモラセス、ビートモラセス等のシュクロースを含有する原料を使用して発酵を行うと、従来のコリネホルム細菌に比べて目的とするL-アミノ酸又は核酸の生産速度が大いに増大する。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。なお、アミノ酸、ビタミン等の栄養要求性変異株を宿主に使用する場合には、その株が要求する栄養素を培地に適宜加える必要がある。

【0028】培養は、好気的条件下で行うのがよく、培養温度を24~42℃、pHを5~9に制御しつつ、培養液中へのL-アミノ酸又は核酸の生成蓄積が実質的に終了するまで行われる。pHの調整には、無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更には尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガス等が使用される。かくして培養を行うことにより培養液中に著量のL-アミノ酸又は核酸が生成蓄積される。蓄積されたL-アミノ酸又は核酸は、晶析、イオン交換樹脂処理等公知の方法を組合せることにより培養液中より適宜採取することができる。

【0029】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。

【0030】実施例1 (シュクラゼ遺伝子のプレバクテリウム・ラクトファーメンタムへの導入と発現)
 特開平5-244958号記載の方法により、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム由来のシュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片を挿入したプラスミドpBS3-43を取得し、更に当該DNA断片をエシェリヒア・コリとコリネホルム細菌のシャトルベクターpSAC4に連結させたプラスミドpSSM30を構築した。pSSM30を保有させたエシェリヒア・コリ JM109の菌体からpSSM30を調製し、電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) によってプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869を形質転換した。pSSM30を保持するATCC13869株 (以下、ATCC13869/pSSM30と記す) を100mlのCM2G培地 (酵母エキス10g/l、ポリペプトン10g/l、グルコース5g/l、NaCl5g/l、pH7.0) で培養し、菌体を遠心分離により回収し洗浄後、超音波処理によって破碎し、10万Gの遠心力で分画した上澄を得た。この上澄150μlと0.5Mシュクロース溶液50μlを混合し、30℃にて30分反応を行った。ついで100℃で3分間加熱して反応

を停止させ、反応液中に生成したグルコースをグルコースCテストワコーによって定量することによりシュクラゼ活性を測定した。なお、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869はもともと菌体内にシュクラゼ活性を持っているため、比較のためpSSM30のベクター部分であるpSAC4のみを保持するATCC13869株 (ATCC 13869/pSSM30) についても同様に測定を行った。

【0031】結果を表1に示す。シュクラゼの活性の単位は、1時間に1mgのグルコースを生成する活性を1 unitとし、粗酵素液中の蛋白質1mgあたりの活性として表示した。表1から明らかなように、pSSM30を導入した株は明らかにシュクラゼ活性が増強されていることが確認された。

【0032】

【表1】

菌 株	シュクラゼ活性 (units)
ATCC13869/pSSM30	5.7
ATCC13869/pSAC4	0.72

【0033】なお、pSSM30を保有させたエシェリヒア・コリ JM109は、AJ13047と命名され、平成6年9月14日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にバタベスト条

約に基づく寄託がなされており、受託番号FERM BP-4800が付与されている。

【0034】実施例2 (シュクラゼ遺伝子の塩基配列の決定)

pBS3-43に挿入されたDNA断片のうち、約6kbのSma I断片と、それに含まれるシュクラゼ遺伝子上流方向に約1kbについて、蛍光標識法により塩基配列を決定した。この配列を配列表配列番号1に示す。本配列にはオープン・リーディング・フレームが4個存在しているが (ORF-F1: 342~1505, ORF-F2: 2338~3609, ORF-F3: 4438~5358, ORF-F4: 5570~6577)、既知のシュクラゼ遺伝子との同源性比較により、プレバクテリウム・ラクトファーマンタムのシュクラゼの構造遺伝子は、配列番号1の2338番目から3609番目に至る塩基配列から成るORF-F2であり、424個のアミノ酸残基から成る蛋白質をコードするものと推定された。また、ORF-F1、ORF-F3及びORF-F4について蛋白質のデータベースNBRFにより同源性検索を行ったところ、表2に示す結果を得た。ORF-F3とORF-F4については既知の蛋白質と高い同源性が見いだされ、それらの間に関係があると考えられる。

【0035】

【表2】

ORF No.	アミノ酸数	同源性のある既知の蛋白質	同源性(%)
F1	388	N-アセチルグルコサミン-6リン酸デヒドロゲナーゼ 由来: エシェリヒア・コリ アミノ酸数: 382	24
F3	307	UDP-N-アセチルムラモイルアラニル-D-グルタミル-メソ-6-デヒドロキシメチルシキナーゼ 由来: パチルス・サチルス アミノ酸数: 494	36
F4	336	ホスホ-N-アセチルムラモイルペンタペプチドトランスフェラーゼ 由来: パチルス・サチルス アミノ酸数: 324	39

【0036】実施例3 (シュクラゼ遺伝子を含むプラスミドのL-リジン生産菌への導入とL-リジン生産への影響)

エシェリヒア・コリ AJ13047の菌体からプラスミドpSSM30を調製し、L-リジン生産菌であるプレバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ11082 (NRRL B-11470) に電気パルス法を用いて導入した。形質転換体を5 µg/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート (グルコース5g/l、ポリペプトン10g/l、酵母エキス10g/l、NaCl 5g/l、DL-メチオニン0.2g/l、寒天15g/l、pH7.2) 上に選択し、形質転換体を取得した。取得した形質転換体をAJ11082/pSSM30と命名した。

【0037】AJ11082及びAJ11082/pSSM30をシュクロースを含む培地にて培養し、L-リジンの発酵生産を行なった。1 l容ジャーファーマンターに入れた表3に示す組成のリジン生産用培地300 mlに各菌株を接種し、培養

温度31.5℃でアンモニアガスにてpHを7.0に調整しつつ通気攪拌培養を行なった。初発に加えたシュクロースを消費し尽くした後は、培養液中のシュクロース濃度が1~3g/dlの範囲にコントロールされるように別に殺菌した60g/dlのシュクロースと8g/dlの硫酸アンモニウムを混合溶液を連続的にフィードし、フィード液150mlを消費し終わるまで培養を行なった。培養時間とL-リジン蓄積量、及び培養終了後の菌体より常法に従って調製した粗酵素液のシュクラゼ活性を測定した結果を表4に示す。シュクラゼ遺伝子の導入により、シュクロースからのL-リジンの発酵生産速度が大幅に向上した。また、遺伝子導入株では菌体内のシュクラゼ活性が増強されていることが確認された。

【0038】

【表3】

成分	濃度
シュクロース	100 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	55 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/l
大豆蛋白加水分解物	50 ml/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/l
ニコチン酸アミド	5 mg/l

[0039]

[表4]

菌株	培養時間 (hr)	L-リジン蓄積 (g/dl)	シュクレゼ活性 (units)
AJ11082	65	9.5	0.35
AJ11082/pSSM30	34	9.4	3.54

【0040】実施例4 (シュクレゼ遺伝子プラスミドのプレバクテリウム・ラクトファーマンタム野生株への導入とL-グルタミン酸生産への影響)
実施例3と同様にして、シュクレゼ遺伝子を含むプラスミドpSSM30をプレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869に導入した。形質転換体を5 μg/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート上にて選択し、形質転換体を取得した。取得した形質転換体をATCC 13869/pSSM30と命名した。

【0041】 ATCC13869及びATCC13869/pSSM30をシュクロースを含む培地にて培養し、L-グルタミン酸の発酵生産を行なった。1 l容ジャーファーマンターに入れた表5に示す組成のグルタミン酸生産用培地300mlに各菌株を接種し、培養温度31.5℃でアンモニアガスにてpHを6.5に調整しつつ通気攪拌培養を行なった。初発に加えたシュクロースを消費し尽くした後は、培養液中のシュクロース濃度が1~3 g/dlの範囲にコントロールされるように別に殺菌した60g/dlのシュクロースと8 g/dlの硫酸アンモニウムの混合溶液を連続的にフィードし、フィード液150mlを消費し終わるまで培養を行なった。培養時間とL-グルタミン酸蓄積量を表6に示す。シュクレゼ遺伝子を導入した株では、シュクロースからのL-グルタミン酸の発酵生産速度が大幅に向上した。

[0042]

[表5]

成分	組成
シュクロース	100 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 g/l
KH ₂ PO ₄	2.5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g/l
大豆蛋白加水分解物	50 ml/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/l
サイアミン・HCl	350 μg/l
ピオチン	3.5 μg/l

[0043]

[表6]

菌株	培養時間 (hr)	L-リジン蓄積 (g/dl)
ATCC13869	45	10.7
ATCC13869/pSSM30	29	10.9

【0044】実施例5 (シュクレゼ遺伝子断片の縮小化)

pSSM30中のシュクロース代謝速度向上に必要な領域を特定するため、挿入DNA断片の縮小化を行なった。遺伝子配列よりシュクレゼ遺伝子を含むと予想される配列表の2157塩基目より存在するSacIIサイトより3724塩基目より存在するBamIサイトまでの領域を含む1.5kbのDNA断片をpSSM30より抽出し、両端を平滑末端化した後、エシエリヒア・コリ用ベクターpHSG399のSmaIサイトに挿入した。更に、プレバクテリウム中で複製可能なプラスミドとするため、プレバクテリウムのプラスミドの複製起点の導入を行なった。プレバクテリウムの複製起点を有するプラスミドpHC4 (特開平5-7491号参照)より3 kbの複製起点DNA断片を抽出し、両端の制限酵素部位をリンカーの連結によりBamHIサイトに改変した後、1.5 kbの上記DNA断片が連結されたpHSG399のBamHIサイトに挿入した。作製したプラスミドをpSSM30BSと命名した。

【0045】実施例6 (縮小型シュクレゼ遺伝子プラスミドのL-リジン生産菌への導入とL-リジン生産への影響)

縮小型シュクレゼ遺伝子プラスミドpSSM30BSをL-リジン生産菌であるプレバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ11082 (NRRL B-11470)に電気パルス法を用いて導入した。5 μg/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート上にて形質転換体を取得し、AJ11082/pSSM30BSと命名した。

【0046】実施例3と同様にして、AJ11082及びAJ11082/pSSM30BSをシュクロースを含む培地にて培養し、L-リジンの発酵生産を行なった。培養時間とL-リジン蓄積量、及び培養終了後の菌体より常法に従って調製した粗酵素液のシュクレゼ活性を測定した結果を表7に示す。シュクレゼ遺伝子の導入により、シュクレゼ

活性が増強され、シュクロースからのL-リジンの発酵生産速度が大幅に向上した。

【0047】

【表7】

菌 株	培養時間 (hr)	L-リジン蓄積 (g/dl)	シュクロース活性 (units)
AJ11082	67	9.9	0.39
AJ11082/pSSM30BS	35	9.5	4.10

【0048】実施例7（縮小型シュクラゼ遺伝子プラスミドのプレバクテリウム・ラクトファーマンタム野生株への導入とL-グルタミン酸生産への影響）

縮小型シュクラゼ遺伝子プラスミドpSSM30BSをプレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869に電気パルス法を用いて導入した。5 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート上にて形質転換体を取得し、ATCC13869/pSSM30BSと命名した。

【0049】実施例4と同様にして、ATCC13869及びATCC13869/pSSM30BSをシュクロースを含む培地にて培養し、L-グルタミン酸の発酵生産を行なった。培養時間とL-グルタミン酸蓄積量を表8に示す。シュクラゼ遺伝子の導入により、シュクロースからのL-グルタミン酸の発酵生産速度が大幅に向上した。

【0050】

【表8】

菌 株	培養時間 (hr)	L-グルタミン酸蓄積 (g/dl)
ATCC13869	43	10.2
ATCC13869/pSSM30BS	30	10.3

【0051】

【発明の効果】コリネホルム細菌に由来し、シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターを連結して得られる組換えDNAを、L-アミノ酸又は核酸生産能を有するコリネホルム細菌に導入し、該細菌を

シュクロースを含む液体培地に培養する本発明の方法によれば、シュクロースから短時間に効率的にL-アミノ酸又は核酸を製造することができる。

【0052】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：6911

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム・ラクトファーマンタム

株名：ATCC13869

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：342..1505

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：2338..3609

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：4438..5358

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：5570..6577

特徴を決定した方法：P

配列

```

AGTCCGTCGA CGCCACCATT GATGTGGTGG TCA
CCGAGCT TGC GGAGGCT TTCTACATCT 60
ACGCTCCCGT CGGCGTGGAG TGGGGTTCATT ACG
GGTGGGA TCACGCCGGT GAAAGTTGCG 120
GAACCCATGG TGTTCTTGT GGGTTGAGGG AAC
GAGTGCG GGTGAGAAGT TTTTCAAGTG 180
TCTGCAGTTT TTAAGTTATG CATCATCAGC TTG
GAAGGCT GAGGTAATTC AGTAGACCTG 240
CAACAGCAGG CCTCAAGTCC GAAGATAATT AAC
CTAGATC CGTAGACATA AGACATCATA 300
CGTCCTATGC TTGCTGGAAG GAACCAAATA ACC
TCAGAAA GATGGCAGAA GTGGTGCATT 360
ATCAAGAAAA TGCAGGTCAA GCAGTTAAAA AAA
TTGAGGG AAGAATTGTT CCCCCCTCG 420
GGGTGATTGA TGGCTTTCTC CAACTCGAAA ACG

```

GCATCAT CACGGAAGCTC TCTGGAGAAC 480
CAGCACCTAA AAACGCAGGA TTCCACCCCG AAC
TCCCCAC GATTGTTCCC GGTTTTATTG 540
ATCTTCATAA TCACGGTGGA AACGGTGGCG CGT
TTCCTAC GGGAACGCAG GACCAGGCGA 600
GGAACACCGC GCAGTATCAC CGCGAACATG GCA
CGACCGT GATGTTGCCA AGCATGGTTT 660
CGGCGCCGGC TGACGCACTG GCAGCGCAGG TGG
AAAACCT TATTCCCTTG TGTGAAGAGG 720
TCCTGCTGTG CGGCATTAC CTCGAGGGCC CTT
TCATCAA CGCATGCCGT TGTGGTGCTC 780
AAAACCCGGA TTTCATTTTT CCCGGCAACC CAA
CAGATCT TGCCCGGGTG ATCCATGCGG 840
GAAAAGGTTG GATCAAATCG ATCACAGTAG CGC
CGGAAAC TGACAATCTT TCTGAGCTTC 900
TCGATCTCTG CGCAGCGCAC CACATCATTG CTT
CCTTCGG GCACACTGAT GCAGATTTTG 960
ATACCACTAC CAGCGCAATT GCCTTGGCTA AAG
AGAAAAA TGTGACGGTC ACGGCTACGC 1020
ATTTGTTCAA TGCGATGCCT CCGCTGCATC ATA
GGGCTCC CGGCAGCGTG GGCGCTTTGC 1080
TTGCTGCGGC ACGTGCCGGG GACGCATATG TTG
AGTTGAT CGCCGACGGC GTGCATTTGG 1140
CCGATGGAAC GGTCGATCTA GCTCGTTCCA ACA
ACGCCTT TTTCATCACG GACGCCATGG 1200
AAGCCGCCGG AATGCCAGAC GGTGAGTACA TTT
TGGGCGT TTTGAACGTC ACCGTCACCG 1260
ATGGAGTCGC CCGTCTGCGC GATGGCGGCG CCA
TCGCCGG GGGCACCAGC AACTAGCGA 1320
GTCAGTTCGT GCACCACGTG CGCAGGGGTA TGA
CGCTTAT CGACGCGACC CTCCACACCT 1380
CAACCGTCGC CGCTAAAATT CTCGGTCTTG GCG
ATCACGA AATCGCTAAA TCCAACCCTG 1440
CAAATTTTGT GGTCTTTGAC TCAAACGGCC AGG
TGCAAAA GGTCCATTTA GGTCATCAAG 1500
TACTTTAAGT ACGAGTAAAA CTATCCTGAT TTT
AAAGGAG TCCCACCATG GAAATCACTA 1560
TCTGCAAAGA CGAGCAAGAA GTCGGCAAAG CAG
TTGCAGT CCTAATCGCA CCCTTCGCCA 1620
ACAAGGGTGG AACCTTGGGG CTTGCAACAG GAT
CCTCACC ACTGAGTACC TACCAAGAGC 1680
TCATTCGCAT GTATGAAGCT GGGGAAGTGT CAT
TCAAGAA CTGCAAGGCA TTCTTGTTGG 1740
ATGAATACGT GGGACTAACC CGTGACGATG AAA
ACAGCTA CTTTAAAACC ATTCGCAAAG 1800
AGTTCACTGA CCACATCGAC ATCGTTGATG AAG
AGGTCTA CAGCCCAGAT GGTGCAAACC 1860
CTGATCCATA CGAAGCAGCT GCAGAGTATG AGG
CAAAGAT CGCTGCAGAA TCCGTTGAAG 1920
TTCAAATCCT TGGCATCGGC GGAAACGGCA CAT

CGCTTTC ATTGAACCAT CATCTTCTCT 1980
GTCAGGACTG ACAAAGGTCC AGGCGCTGCA CCC
TAAAACT GTGGAGGACA ACGCTCGATT 2040
CTTCAACACC ATCGAAGAGG TCCCAACCCA CGC
CGTCACC CAGGGTTTGG GCACTTTGTC 2100
CCGCGCGCAA AACATCGTGT TGGTGGCAAC TGG
TGAAGGA AAAGCCGACG CCATCCGCGG 2160
AACTGTGGAA GGCCCAGTGA CTGCTTCTTG CCC
AGGTTCC ATCCTGTAGA TGCACAACAT 2220
GCCACCATCA TCGTTGGATG AAGCAGCAGT ATC
CAAGCTG GAAAACGCTG ATCACTACCG 2280
TCTCATGGAG CAATTAAAGC TGCGCTAGAA ACA
AAAAGGA AAGTACTGTG TGGGGCTATG 2340
CACACAGAAC TTTCCAGTTT GCGCCCTGCG TAC
CATGTGA CTCCTCCGCA GGGCAGGCTC 2400
AATGATCCCA ACGGAATGTA CGTCGATGGA GAT
ACCCTCC ACGTCTACTA CCAGCACGAT 2460
CCAGGTTTCC CCTTCGCACC AAAGCGCACC GGC
TGGGCTC ACACCACCAC GCCGTTGACC 2520
GGACCGCAGC GATTGCAGTG GACGCACCTG CCC
GACGCTC TTTACCCGGA TGCATCCTAT 2580
GACCTGGATG GATGCTATTG CCGTGGAGCC GTA
TTTACTG ACGGCACACT TAACTTTTC 2640
TACACCGGCA ACCTAAAAAT TGACGGAAAG CGC
CGCGCCA CCCAAAACCT TGTCGAAGTC 2700
GAGGACCCAA CTGGGCTGAT GGGCGGCATT CAT
CGCCGTT CGCCTAAAAA TCCGCTTATC 2760
GACGGACCCG CCAGCGGTTT CACACCCCAT TAC
CGCGATC CCATGATCAG CCCTGATGGT 2820
GATGGTTGGA ACATGGTTCT TGGGGCCCAA CGC
GAAAACC TCACCGGTGC AGCGGTTCTA 2880
TACCGCTCGA CAGATCTTGA AAACCTGGGAA TTC
TCCGGTG AAATCACCTT TGACCTCAGT 2940
GATGCACAAC CTGGTTCTGC TCCTGATCTC GTT
CCCGATG GCTACATGTG GGAATGCCCC 3000
AACCTTTTTTA CGCTTCGCGA TGAAGAACT GGC
GAAGATC TCGACGTGCT GATTTTCTGT 3060
CCACAAGGAT TGGACCGAAT CCACGATGAG GTT
ACTCACT ACGCAAGCTC TGACCAAGTGC 3120
GGATATGTG TCGACAAGCT TGAAGGAACG ACC
TTCCGCG TCTTGCGAGG ATTCAGCGAG 3180
CTGGATTTCG GCCATGAATT CTACGCACCG CAG
GTTGCAG TAAACGGTTC TGATGCCTGG 3240
CTCGTGGGCT GGATGGGGCT GCCCGCGCAG GAT
GATCACC CAACAGTTGC ACAGGAAGGA 3300
TGGGTGCACT GCCTGACTGT GCCCGCAAG CTT
CATTTGC GCAACCACGC GATCTACCAA 3360
GAGCTCCTTC TCCAGAGGG GGAGTCGGGG GTA
ATCAGAT CTGTATTAGG TTCTGAACCT 3420
GTCCGAGTAG ACATCCGAGG CAATATTTCC CTC

GAGTGGG ATGGTGTCCG TTTGTCTGTG 3480
GATCGTGATG GTGATCGTCG CGTAGCTGAG GTA
AAACCTG GCGAATTAGT GATCGCGGAC 3540
GATAATACAG CCATTGAGAT AACTGCAGGT GAT
GGACAGG TTTCATTTCG TTTTCCGGGC 3600
CTTCAAAGGT GACACTATTG AGAGATAAGT CAT
ATAAAAG GGTCTTTTGT GGCGAATTGT 3660
ACAAATACTT CGCAAAATCC CTTGATCTAG TTA
TTGTCAC TGATGACAAC CCTCGTTCAG 3720
AGGTGCCTGC CACGATTTCG GCAGCAGTCA CTG
CAGGAGC ACAGCAGGGT GCTTCAGAGT 3780
CCGAACGACC GGTGGAAGTC CTAGAAATTG GTG
ACCGTGC AGAAGCAATT CGCGTTTTTG 3840
TCGAGTGGGC ACAGCCTGGA GATGGCATTG TAG
TAGCTGG AAAAGGCCAT GAAGTTGGAC 3900
AACTAGTTGC TGGTGTCCACC CACCATTTTG ATG
ACCGCGA AGAAGTTCGC GCTGCTTTGA 3960
CAGAAAAGCT CAACAATAAA CTTCCCCTTA CTA
CGGAAGA AGGATAGGCC ACAGTCATGA 4020
TCACAATGAC CCTTGGGGAA ATCGCTGACA TCG
TTGGAGG CAGGCTTACT GGCGGTGCTC 4080
AAGAAGATAC GCTTGTGAGC TCCAGCGTGG AAT
TTGATTC TCGATCCCTC ACACCGGGTG 4140
GCTTGTTTTT AGCACTTCCG GGTGCTCGTG TAG
ACGGGCA TGATTTTGCT GCAACTGCAA 4200
TTGAGAAAGG TGCGGTGCGA GTATTGGCAG CCC
GTGAGGT TGACGTACCT GCGATCGTCG 4260
TGCCTCCAGT AAAAATCCAG GAATCCAATG CTG
ACATTTA TGCTCATGAT CCAGATGGGC 4320
ATGGCGCGGC GGTAGTGGAG GCGTTGGTCT CGG
TTGGCTC GCCACGTGGT GGATATCTGC 4380
GTGGATGGCC ATCAATTGAA CGTTGTGGCT ATT
ACTGGTT CTGTGGGAAA GACTTCTATG 4440
AAGGATTTCA TCGCGACGGT TCTTGGCCAA GAT
GGGCCAA CTGTGGCTCC TCCGGGCTCG 4500
TTTAACAATG AGCTTGGTTT GCCACACACC GCG
CTCCGCT GCACAACCGA TACTAAGTAT 4560
TTGGTGGCTG AGATGTCCGC GCGTGGCATT GGA
CATATTA AGCACCTGAC AGAGATTGCT 4620
CCGCCACGGA TTGCAGCTGT GCTCAACGTC GGC
CATGCGC ACCTGGGTGA ATTTGGATCC 4680
CGCGAGAATA TCGCGCAGGC AAAAGGCGAG ATC
ATTGAAG CGCTGCCCTC GAAGAAAACG 4740
GGTGGGGTAG CAGTCCTTAA CGCTGACGAT CCT
TTTGTCG CCCGGATGGC TCCACGCACT 4800
AAGGCGCGCG TGGTGTGGTT TACCACCGAT GCA
GGTCAAG CAAAAAAGTC TGATTATTGG 4860
GCAACGAGTA TTTCACTGGA CGCTGTTGCG CGG
GCAAGCT TTACGCTGAA CACGAAGGAC 4920
GGGTCTTGGC CGGTCGCCCT GCAGGTTTTT GGT

GAGCACC AGGTTGCTAA TGCACTTGCT 4980
GCTGCTGCCA TTGCCATGGA AGCTGGCGTC GCC
CCAGAAT TGGTGGTTGC TGGATTGGAA 5040
GCACATTCAG CGGCTTCCGC GCACCGCATG GAT
GTAAAGA CCCGCGCCGA CGGCGTGACC 5100
ATCATCAACG ATTCTTACAA CGCGAATCCT GAT
TCTATGC GTGCAGGTAT CGCGGCTCTT 5160
GCGTACACAG CTAGTGGTCG TTCTCTGAAG CAA
CAAGCTG GGCAGTGCTT GGTCAAATGG 5220
GTGAGCTTGG CGATGACGCC TCGGAAGCCC ATG
CCGAACT TGGTGCTGAG CTGCCTAAAT 5280
ACAATGTTCA AGAACTTGTC GCAGTGGGGG AGA
ACCCTAC CTGTGCAGCA CTTGCAGAGT 5340
CCGCAGCGAG CCTGGGTGTG AGTACTCACG TAG
TTTCAGA CGTTGATGCA GCGCTCGAGT 5400
TGCTCGCAGC CCATATTAAG CGGGATGATG TAG
TGCTGGT TAAGGCTTCA AATGCTGATC 5460
GCCTGTGGAG GGTGCGAGAA GCACTACATG GCA
TGGTGCC GGCCTCAAAA ACACAGGTGG 5520
CTCGGTCAAC GACGATTCTC GTCGGAACGT GGA
AGGACAG TAGAAAACAA TGCAACAGAT 5580
TATGGTCACT GGAACGGTTG CGTTCCTCGT CTC
AATCTTT CTCACCCCGG TGTTGATCCG 5640
TTATTTTCACT AACCGCCAGT TGGGCCAGGA AAT
CCGTGAA GAAGGCCTGC AGTCTCACTT 5700
GCGTAAGCGT GGCAC TCCAA CCATGGGTGG CAT
TGCGATT ATCGCGGGCA TTGTTGTGGC 5760
CTATGTGTTT ACCAATATCT TGGCCATGAT CCA
AGGCGTT GGTGGATTCA CAGTCTCCGG 5820
CTTGCTCGTG TTGGGTCTGA CCTTGGGCCT TGG
TGCCACT GGCTTCGCCG ATGACTTCAT 5880
CAAGCTGTAC ATGAACCGAA ACCTTGGTTT GAA
CAAGACC GCTAAGCTGG TGTCTCAGCT 5940
GGCCATTGCG TTGATCTTTG GTTTTTTGGT ACT
GCAGTTT CCCGATGAAA ACGGTCTGAC 6000
CCCAGCATCA ACCACCTGT CATTCAATCG CGA
TATCGAC ACCATTGACC TTGGCTTCGG 6060
GGACAGCGTT TTTGGCATCA TCGTGTTCTT CAT
TTTTATC TACGTTGTGG TCAGCGCGTG 6120
GTCGAATGCC GTGAACATCA CTGATGGTTT GGA
TGGTTTG GCTGCAGGTA CCACAGCATT 6180
TGTCATGGGT GCTTACACCT TGATCACGTT CTG
GCAGTTC CGAACTCCT GCGATACTGC 6240
AGTGGAAGCG GGTTGCAATA CGGTGCGTGA TCC
ACTGGAT TTGTCTGTGT TGTGCGCTGC 6300
TGGTCTGGCG CCACCTTGGG CTTTCTGTGG TGG
AATGCGG CACCGACAAA GATCTTCATG 6360
GGCGATACTG GTTCTTTGGC ACTGGGCGGT TTG
GTTGCAG GTATTTCTGT GGTTAGCCGC 6420
ACCGAGCTGC TCATGGTTAT CATCGGCGCG CTG

110
Arg Ala Thr Gln Asn Leu Val Glu Val
Glu Asp Pro Thr Gly Leu Met

105										110									
115																			
Gly	Gly	Ile	His	Arg	Arg	Ser	Pro	Lys											
Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gly	Pro													
	120					125													
130																			
Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Pro	His	Tyr	Arg											
Asp	Pro	Met	Ile	Ser	Pro	Asp													
	135				140														
145										160									
Gly	Asp	Gly	Trp	Asn	Met	Val	Leu	Gly											
Ala	Gln	Arg	Glu	Asn	Leu	Thr													
				165															
170										175									
Gly	Ala	Ala	Val	Leu	Tyr	Arg	Ser	Thr											
Asp	Leu	Glu	Asn	Trp	Glu	Phe													
				180														185	
190																			
Ser	Gly	Glu	Ile	Thr	Phe	Asp	Leu	Ser											
Asp	Ala	Gln	Pro	Gly	Ser	Ala													
				195														200	
205																			
Pro	Asp	Leu	Val	Pro	Asp	Gly	Tyr	Met											
Trp	Glu	Cys	Pro	Asn	Leu	Phe													
						215													
220																			
Thr	Leu	Arg	Asp	Glu	Glu	Thr	Gly	Glu											
Asp	Leu	Asp	Val	Leu	Ile	Phe													
					230														
235										240									
Cys	Pro	Gln	Gly	Leu	Asp	Arg	Ile	His											
Asp	Glu	Val	Thr	His	Tyr	Ala													
				245															
250										255									
Ser	Ser	Asp	Gln	Cys	Gly	Tyr	Val	Val											
Asp	Lys	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr													
				260														265	
270																			
Phe	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Phe	Ser	Glu											
Leu	Asp	Phe	Gly	His	Glu	Phe													
				275														280	
285																			
Tyr	Ala	Pro	Gln	Val	Ala	Val	Asn	Gly											
Ser	Asp	Ala	Trp	Leu	Val	Gly													
				290														295	
300																			
Trp	Met	Gly	Leu	Pro	Ala	Gln	Asp	Asp											
His	Pro	Thr	Val	Ala	Gln	Glu													
					310														
305																			
315										320									

Gly Trp Val His Cys Leu Thr Val Pro
 Arg Lys Leu His Leu Arg Asn
 325
 330 335
 His Ala Ile Tyr Gln Glu Leu Leu Leu
 Pro Glu Gly Glu Ser Gly Val 345
 340
 350
 Ile Arg Ser Val Leu Gly Ser Glu Pro
 Val Arg Val Asp Ile Arg Gly 360
 355
 365
 Asn Ile Ser Leu Glu Trp Asp Gly Val
 Arg Leu Ser Val Asp Arg Asp 375
 370
 380
 Gly Asp Arg Arg Val Ala Glu Val Lys
 Pro Gly Glu Leu Val Ile Ala
 385 390
 395 400
 Asp Asp Asn Thr Ala Ile Glu Ile Thr
 Ala Gly Asp Gly Gln Val Ser
 405
 410 415
 Phe Ala Phe Pro Gly Leu Gln Arg
 420

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 土屋 誠
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
 素株式会社中央研究所内
 (72) 発明者 松井 裕
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
 素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 吉原 康彦
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
 素株式会社生産技術研究所内
 (72) 発明者 中松 亘
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
 素株式会社生産技術研究所内